MycAssay™ Pneumocystis
série Stratagene Mx3000
Échantillons Respiratoires
REF 080-035

Usage prévu

L'utilisation de MycAssay™ Pneumocystis, réservée au personnel de laboratoire qualifié, est indiquée pour la détection qualitative d'ADN génomique de *Pneumocystis jirovecii* extrait d'échantillons respiratoires des voies respiratoires inférieures (par exemple, échantillons bronchiques) comme aide au diagnostic chez les patients adultes suspects de pneumonie à *P. jirovecii*.

Le test MycAssay™ Pneumocystis a été validé pour une utilisation sur les automates de la série Stratagene Mx3000 (Mx3000P® et Mx3005P®) avec le logiciel MxPro version 4.10.

Résumé et explication

La pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (anciennement *carinii*) (PPC) est une pneumonie opportuniste commune chez les patients immunodéprimés, en particulier ceux atteints d'une infection à VIH à un stade avancé ou du SIDA [1]. Il s'agit généralement d'une infection extra-hospitalière subaiguë qui provoque une insuffisance respiratoire progressive pouvant entraîner la mort [2] en l'absence de traitement. Un traitement préventif par le triméthoprime sulfaméthoxazole (Bactrim ou Septrin) est systématiquement administré à la plupart des patients à risque, une pratique qui a permis de considérablement réduire le nombre de cas de PPC mais des percées ont toutefois lieu et les individus qui ne connaissent pas leur séropositivité peuvent découvrir qu'ils sont atteints du SIDA au moment du diagnostic de la PPC [3]. La PPC touche également d'autres catégories de patients immunodéprimés tels que les receveurs d'une greffe d'organe plein et les patients atteints d'hypogammaglobulinémie ou de leucémie chronique.

À l'heure actuelle, le diagnostic de la PPC repose sur des méthodes de microscopie car il est impossible de réaliser des cultures de routine de *P. jirovecii* en laboratoire de microbiologie. Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le mode de prélèvement le plus courant. Les méthodes courantes de diagnostic comprennent notamment l'immunofluorescence (ou immunofluorescence directe) et la coloration histologique des échantillons [4].

MycAssay™ Pneumocystis est un kit de diagnostic moléculaire pour la détection de *P. jirovecii* qui repose sur la technologie de la PCR à balises moléculaires [5]. Le mode opératoire complet, extraction d'ADN de l'échantillon clinique comprise, peut être réalisé en 4 heures voire 2 heures si l'ADN extrait est disponible immédiatement. Ce test offre l'avantage direct d'une amélioration de l'efficacité du laboratoire associée à une rapidité d'analyse pour des bénéfices cliniques probables. L'exactitude de diagnostic du test dépend en grande partie de la qualité de l'échantillon.

Principes du test

Après mélange des réactifs du kit MycAssay™ Pneumocystis avec un échantillon contenant la séquence cible d'ADN de *Pneumocystis* (une partie de la grande sous-unité ribosomale mitochondriale de *Pneumocystis*), un cycle thermique entraîne l'amplification de l'ADN. Le test utilise également un contrôle interne d'amplification (IAC pour Internal Amplification Control), un fragment d'ADN non présent dans le génome de *Pneumocystis*, d'autres champignons, des bactéries ni de l'homme, pour détecter les substances inhibitrices de la PCR et confirmer la fonctionnalité des réactifs.

Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées par des balises moléculaires. Il s'agit de sondes d'hybridation oligonucléotidiques monobrins qui forment une structure tige-boucle. La boucle contient une séquence de la sonde complémentaire à la séquence de la cible, tandis que la tige est formée par annelage de séquences latérales complémentaires de part et d'autre de la séquence de la sonde. Un fluorophore, qui émet de la fluorescence lorsqu'il est excité par une lumière de longueur d'onde adaptée, est fixé par liaison covalente à une extrémité d'un bras et un extincteur de fluorescence, qui inhibe la fluorescence du fluorophore lorsqu'il en est physiquement proche, est fixé par liaison covalente à l'extrémité de l'autre bras. Libres en solution, les balises moléculaires ne sont pas fluorescentes. Par contre, lors de l'hybridation avec un brin d'acide nucléique contenant une séquence cible, elles subissent un changement de conformation qui les rend fluorescentes. L'intensité de la fluorescence pendant un cycle donné, ou après un cycle,

[1] Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis: 10: 1713-20.
[2] Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG. Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG. Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii.* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. Thorax 2006;61:716-21.
[3] Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA: 286: 2450-60.
[4] Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM; ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). Proc Am Thorac Soc 2006;3:655-64.
[5] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

dépend de la quantité d'amplicons spécifiques présents à ce moment. L'automate de PCR en temps réel Stratagene surveille simultanément la fluorescence émise par toutes les balises.

Précautions

- Ce kit est réservé au diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation du kit est réservée aux professionnels de laboratoire. Les modes opératoires doivent être suivis de manière à éviter la production d'aérosols lors de la manipulation des échantillons. Il convient d'observer les précautions habituelles et les recommandations en vigueur dans l'établissement lors de la manipulation des échantillons. Une fiche de données de sécurité est disponible auprès de Myconostica Ltd.
- Ce test est compatible uniquement avec les automates de la série Stratagene Mx3000 et le logiciel MxPro version 4.10.
- **Au cours des études de validation, les observations suivantes, spécifiques à cet automate, ont été faites :**
  - **Si l'automate vient d'être utilisé, laisser la lampe refroidir pendant au moins 1 h avant de lancer un nouveau test MycAssay™ Pneumocystis. Dans le cas contraire, il existe un risque de perte de sensibilité pouvant entraîner des résultats faussement négatifs.**
  - **Par rapport aux autres automates testés, cet automate présente une précision inférieure à faible concentration et autour de la valeur limite clinique.**
- Ne pas utiliser les réactifs ni les témoins si les sachets protecteurs sont ouverts ou endommagés à la livraison.
- Les réactifs et les témoins ne sont pas interchangeables d'un lot à un autre.
- Ne jamais mélanger les réactifs ou les témoins provenant de différents tubes, même s'ils sont du même lot.
- Ne jamais utiliser les réactifs ni les témoins au-delà de la date d'expiration.
- Il convient de ne pas recongeler ni réutiliser les réactifs et les témoins après ouverture.
- Porter des vêtements de protection et des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit.
- Éviter la contamination des réactifs par les microbes et la désoxyribonucléase (DNAse) lors du prélèvement des parties aliquotes des tubes.
- Il est recommandé d'utiliser des embouts pour pipettes stériles, exempts de DNAse et à usage unique de type filtres à faible rétention ou à déplacement direct.
- Utiliser un embout neuf pour chaque échantillon et chaque réactif.
- Mettre au rebut les réactifs inutilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, régionale et locale en vigueur.
- Afin d'éviter la contamination par les amplicons de *Pneumocystis* et de l'IAC, ne pas ouvrir les tubes de réaction après amplification.
- Ne pas manger, boire ni fumer à proximité des zones de manipulation des échantillons et des réactifs.
- L'ADN à faible concentration peut être instable s'il n'est pas conservé correctement. Il est recommandé de conserver l'ADN extrait à -80 °C afin d'en préserver l'intégrité. Dans la mesure du possible, il convient également d'éviter la décongélation et la recongélation répétées.
- Ce kit a été validé à l'aide de barrettes de 8 tubes de PCR de qualité optique de 0,2 mL munis de bouchons (Agilent Technologies réf. 401428 et 401425). L'utilisation d'autres sources ou types de plastique est susceptible d'invalider les seuils et, par conséquent, les revendications du mode d'emploi. En cas d'utilisation d'une source alternative, il est recommandé de mener une validation locale avec les réactions des contrôles positif et négatif.

Contenu du kit

Description

Le kit est constitué de 5 sachets en aluminium, à 3 compartiments, scellés, utilisables individuellement. Chaque sachet contient les quantités nécessaires de réactifs pour réaliser 8 réactions.

		Volume
Tube 1 (bouchon orange)	dNTP $MgCl_2$ Solution tamponnée de complexe d'ADN polymérases	66 µL
Tube 2 (bouchon bleu)	< 0,01 % d'amorces < 0,01 % de balises moléculaires < 0,0001 % d'IAC L'IAC est un plasmide recombinant contenant une séquence non infectieuse et sans relation avec les séquences cibles (*Pneumocystis*). Tampon Tris/HCl	66 µL
Tube 3 (bouchon transparent)	Témoin négatif Eau	25 µL
Tube 4 (bouchon noir)	Témoin positif < 0,0001 % d'ADN témoin positif La molécule du témoin positif est un plasmide recombinant contenant les séquences cibles de *Pneumocystis*. Tampon Tris/HCl	25 µL

Autres éléments contenus dans le kit :
- CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay™ Pneumocystis Myconostica
- Mode d'emploi
- Certificat d'analyse

Conservation

Il convient de conserver le kit au congélateur (de -15 à -25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit, date au-delà de laquelle il convient de mettre le kit au rebut conformément à la réglementation locale en vigueur.

Le contenu d'un sachet doit être utilisé immédiatement après ouverture. Ne pas le recongeler ni le réutiliser.

Équipement et matériel nécessaires et non fournis

- Automate de PCR en temps réel de la série Stratagene Mx3000 (avec manuel d'utilisation, ordinateur relié et logiciel MxPro version 4.10)
- Barrettes de tubes de PCR de qualité optique (Agilent Technologies réf. 401428)
- Barrettes de bouchons de PCR de qualité optique (Agilent Technologies réf. 401425)
- Microcentrifugeuse avec adaptateur pour tube de PCR de 0,2 mL
- Agitateur vortex
- Portoir pour tubes de PCR
- Micropipettes (volumes de 7,5 µL à 20 µL)
- Embouts filtres stériles à faible rétention
- Gants à usage unique, non poudrés
- Solution de décontamination de l'ADN exclusive
- Marqueur permanent
- Kit d'isolement d'ADN (voir ci-dessous)

Échantillon

L'échantillon à soumettre au test MycAssay™ Pneumocystis est l'ADN total extrait des échantillons cliniques de LBA. À cette fin, il est recommandé d'utiliser le kit d'isolement de l'ADN et l'équipement suivants, fournis par Myconostica Ltd. et employés pour la validation du test :

- Kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra® (RÉF. 080-005 disponible auprès de Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, États-Unis)
- Adaptateur vortex (RÉF. 080-015 disponible auprès de Myconostica)

Remarques sur le mode opératoire

- Lire le protocole dans son intégralité avant de commencer.
- La durée totale du mode opératoire du test MycAssay™ Pneumocystis (extraction d'ADN exclue) est d'environ 2 heures, selon le nombre d'échantillons analysés.
- Il convient de préparer le test sur un poste de travail pour PCR ou dans un laboratoire pré-PCR. Si aucun poste de travail pour PCR n'est disponible, il convient de préparer le test dans une zone dédiée du laboratoire [6], nettoyée régulièrement avec un agent de décontamination de l'ADN.
- Toutefois, les agents de décontamination de l'ADN sont susceptibles d'inhiber la réaction. Il faut donc éviter leur utilisation lors de la préparation de la PCR en temps réel.
- Transvaser les liquides au moyen de micropipettes. Il convient d'utiliser des micropipettes dédiées à la préparation des réactions et de les décontaminer régulièrement.
- Il est recommandé d'utiliser des embouts filtres à faible rétention afin d'éviter toute perte d'ADN pendant la phase de préparation.
- **Manipuler le Tube 4 avec précaution. Il contient une matrice d'ADN qui, en cas de contamination, risque de donner des résultats faussement positifs.**
- Toujours porter des gants.
- Tous les tubes doivent être bouchés après utilisation et avant mise au rebut.
- En cas de traitement simultané de plusieurs échantillons, noter précisément la position des échantillons.
- Afin d'éviter les résultats faussement négatifs, laisser la lampe refroidir pendant au moins 1 h après l'analyse avant de lancer un nouveau test MycAssay™ Pneumocystis. Suite à cette période de refroidissement, la lampe doit subir un préchauffage d'une durée de 20 minutes, comme indiqué en 1.1 ci-dessous.

[6] Voir par exemple Miffin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

Mode opératoire

1. Préparation de la PCR en temps réel

1.1 Pour commencer, mettre en marche le système de PCR en temps réel Stratagene de série Mx3000 (automate et ordinateur relié) et lancer le logiciel MxPro 4.10. Saisir le nom d'utilisateur et le mot de passe si nécessaire. La durée de préchauffage de la lampe est de 20 minutes. Ne pas lancer l'analyse avant que la lampe ne soit prête.

1.2 Vérifier que le plan de travail a été nettoyé à l'aide d'un agent de décontamination de l'ADN et qu'il est sec. Éviter cependant l'utilisation de tels agents pendant la préparation du test car un excès de solution nettoyante peut inhiber la PCR.

1.3 Un sachet contient un Tube 1, un Tube 2, un Tube 3 et un Tube 4. Chaque sachet contient les quantités nécessaires de réactifs pour réaliser 8 réactions. Pour chaque passage, au moins une réaction avec un témoin positif et une réaction avec un témoin négatif doivent être réalisées avec les réactifs d'un même lot du kit. Un sachet permet ainsi d'analyser 6 échantillons. S'il y a plus de 6 échantillons de patient à analyser, plusieurs sachets peuvent être utilisés, à condition que ceux-ci proviennent du même lot du kit. Les 5 sachets du kit permettent d'analyser un maximum de 38 échantillons de patient.

1.4 Calculer le nombre de réactions requises en se reportant au tableau ci-dessous :

Nombre de sachets	Nombre maximum d'échantillons de patient
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

1.5 Sortir le nombre adapté de sachets du congélateur. Ne pas utiliser un sachet non scellé. En cas de congélation des échantillons de patient après extraction, sortir également ceux-ci du congélateur.

1.6 Ouvrir le nombre nécessaire de sachets en les déchirant et en extraire les tubes. En cas d'utilisation de plusieurs sachets mais d'analyse d'un seul jeu de témoins positif et négatif, les Tubes 3 et 4 ne doivent être retirés que d'un seul sachet. **Manipuler le Tube 4 avec précaution. Il contient un témoin positif à base d'ADN qui, en cas de contamination, risque de donner des résultats faussement positifs.**

1.7 Laisser le contenu des tubes décongeler à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. Vérifier que le contenu de chaque tube est entièrement décongelé avant utilisation. Agiter les tubes et les échantillons de patient au vortex pour en mélanger le contenu puis centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse pour s'assurer qu'il ne reste pas de dépôt au fond des tubes avant utilisation.

1.8 Placer le nombre requis de tubes de PCR sur le portoir.

1.9 Préparer toujours le témoin négatif en premier, suivi des échantillons. Il convient de toujours préparer le témoin positif en dernier.

1.10 Les volumes de réactifs et d'ADN sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Réactif	Réaction		
	Témoin négatif	Échantillon de patient	Témoin positif
Tube 1 (bouchon orange)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tube 2 (bouchon bleu)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tube 3 (bouchon transparent)	10 µL	-	-
Échantillon de patient	-	10 µL	-
Tube 4 (bouchon noir)	-	-	10 µL
Volume total	25 µL	25 µL	25 µL

1.11 Ajouter les réactifs dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus : Tube 1 suivi du Tube 2 puis de la matrice (témoin négatif, échantillon ou témoin positif). Faire preuve de précaution lors du prélèvement des parties aliquotes du Tube 1 ; le liquide est légèrement visqueux et peut adhérer à la paroi interne du tube. Si c'est le cas,

procéder à une nouvelle centrifugation pour recueillir le reste du contenu dans le fond du tube avant de tenter de prélever les dernières parties aliquotes.

1.12 Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque transfert de liquide. Après utilisation, reboucher chaque tube réactionnel et jeter immédiatement le tube et le contenu restant dans un conteneur à déchets cliniques scellable. Il est impossible de conserver les réactifs inutilisés pour un usage ultérieur.

1.13 Faire preuve d'une extrême précaution lors du prélèvement à la pipette dans le Tube 4 (ADN témoin positif) afin de ne pas contaminer d'autres tubes réactionnels. Le bouchage des autres tubes réactionnels avant ouverture du Tube 4 peut réduire le risque de contamination croisée.

1.14 Vérifier que tous les tubes réactionnels sont bien bouchés. Noter la position de chaque échantillon sur la barrette de tubes. En cas d'utilisation de plusieurs barrettes, étiqueter le premier tube de chaque barrette. Centrifuger les tubes réactionnels pendant 10 s dans la minicentrifugeuse munie de l'adaptateur pour tubes de PCR de 0,2 mL. Vérifier par un contrôle visuel l'absence de bulles dans le mélange réactionnel.

1.15 Passer aussitôt à la Section 2. Les réactions du test MycAssay™ Pneumocystis restent stables à température ambiante pendant un maximum de 60 minutes.

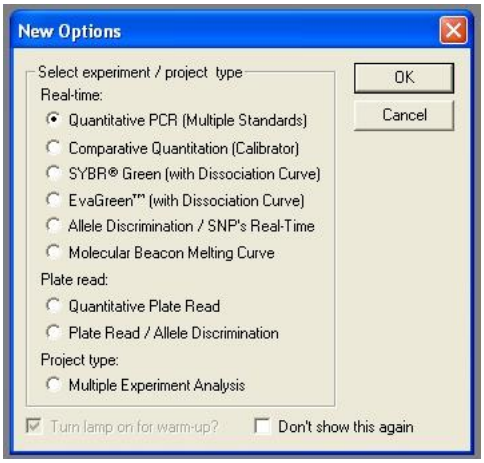
1.16 Après préparation de la PCR, nettoyer soigneusement le plan de travail à l'aide d'un agent de décontamination de l'ADN.

2. Réalisation de l'analyse

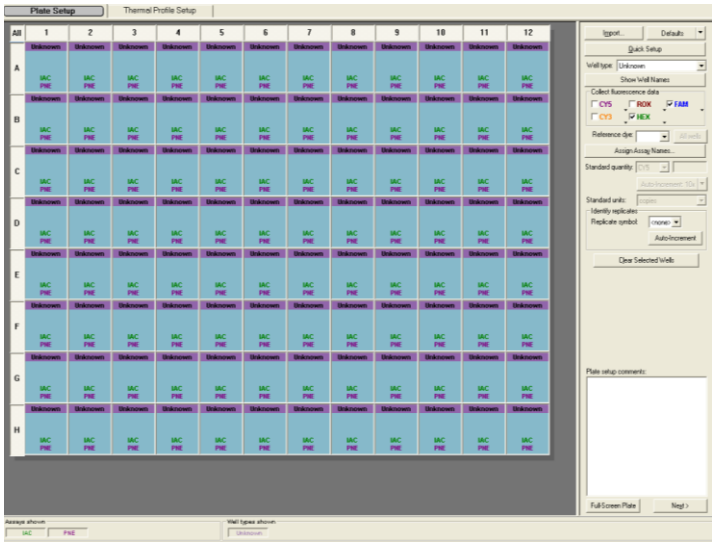
2.1 Démarrer le logiciel MxPro version 4.10.

2.2 Introduire le CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay Pneumocystis Myconostica.

2.3 Dans le menu **New Options**, sélectionner la première option : **Real Time: Quantitative PCR (Multiple Standards)** puis cliquer sur OK, comme indiqué :

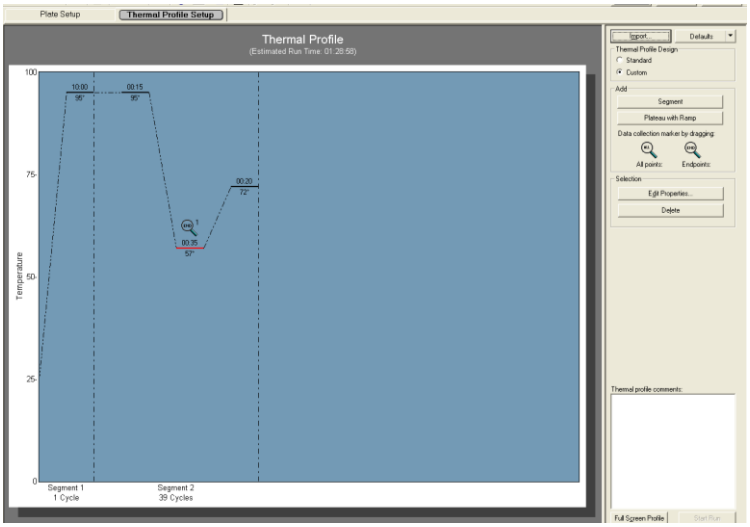


2.4 Dans l'onglet ***Plate Setup***, cliquer sur le bouton **Import**, à droite. Dans le menu déroulant **Look in:**, sélectionner **MycAssay PNE** Myconostica Protocol CD-ROM puis importer le fichier nommé **MycAssay Pneumocystis v3_1.mxp**. Cliquer sur **Finish**. À l'issue de cette étape, l'onglet ***Plate Setup*** doit se présenter comme dans l'exemple suivant :



2.5 Pour les puits vides, il est recommandé de renseigner le champ **Well Type** par la mention **<blank>** (à sélectionner dans la liste déroulante **Well Type**) afin d'éviter les interférences dues à la réfraction de la lumière par le plastique avec le signal des puits contenant un mélange réactionnel.

2.6 Répéter l'importation dans l'onglet ***Thermal Profile*** *Setup* pour le programme de PCR de ce test. Pour ce faire, définir le champ **Thermal Profile Design** sur **Custom** puis importer à partir du même fichier qu'en 2.4. À l'issue de cette étape, l'onglet ***Thermal Plate Setup*** doit se présenter comme dans l'exemple suivant :



2.7 Dans l'onglet ***Plate Setup***, nommer les puits (ou tubes) de manière adaptée. Cliquer avec le bouton droit de la souris sur l'un des puits en surbrillance (ou groupe de puits en cas de réplicats) et sélectionner **Well Information** dans la liste d'options. Saisir le nom de l'échantillon contenu dans ce puits dans le champ **Name:**.

2.8 Après avoir nommé tous les puits, enregistrer l'analyse sous un nom de fichier pertinent comprenant la date et les initiales de l'opérateur. Lancer l'analyse en sélectionnant le bouton **Run** en haut à droite de l'écran de l'onglet **Instrument** puis en cliquant sur le bouton **Start** dans le coin inférieur droit.

2.9 Rappel : L'instrument doit refroidir pendant au moins 1 heure avant de reprendre à l'Étape 1.1.

3. Analyse et interprétation des données

3.1 À la fin de l'analyse, les résultats peuvent être affichés en sélectionnant le bouton **Analysis** en haut à droite de l'écran puis l'onglet ***Results*****.**

3.2 Après avoir sélectionné **Amplification Plots analysis area**, définir les seuils de chaque voie comme suit et verrouiller les valeurs en cliquant sur le verrou :

PNE = 500)

IAC = 100

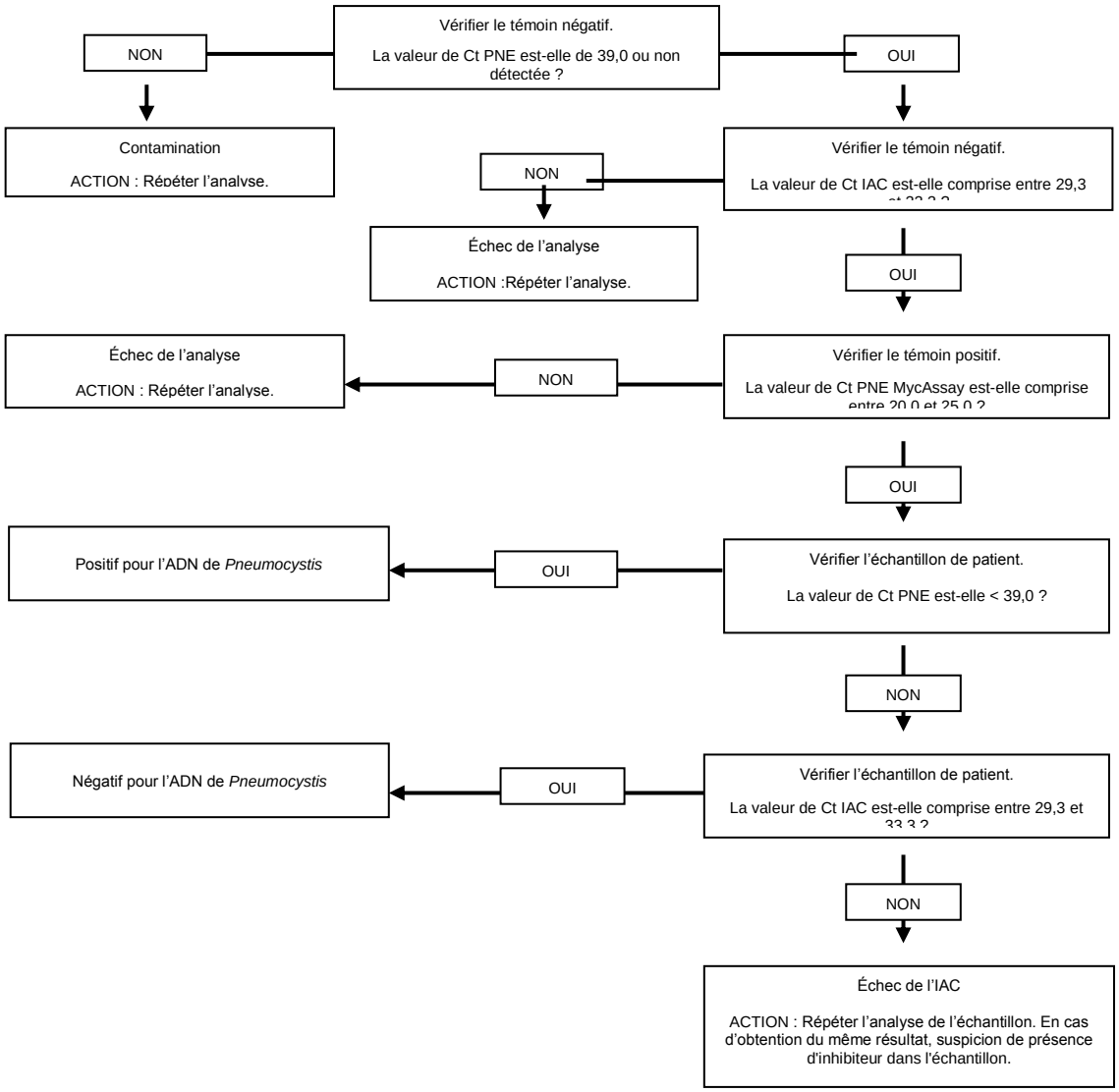
3.3 Le paramètre **Adaptive Baseline** doit également être sélectionné, ce qui est généralement le cas par défaut pour ce logiciel.

3.4 Enregistrer les modifications. Chaque voie peut être affichée séparément en activant ou désactivant les cases de la section Assays Shown, en bas à gauche de l'écran.

3.5 Il est possible d'exporter les données dans Excel pour un traitement supplémentaire en sélectionnant ***File***>***Export Text Report***>***Export Text Report to Excel***. Seuls les puits ou colorants mis en surbrillance sont exportés donc veiller à sélectionner tous les éléments nécessaires.

3.6 Ouvrir le fichier .csv avec Excel ou un autre tableur équivalent.

3.7 Analyser chaque échantillon, en commençant par les témoins, comme indiqué dans l'organigramme ci-dessous (plus d'informations sont fournies dans le tableau situé en dessous de l'organigramme).


Vérifier le témoin négatif.
La valeur de Ct PNE est-elle de 39,0 ou non détectée ?
NON
OUI
Contamination
ACTION : Répéter l'analyse.
Vérifier le témoin négatif.
La valeur de Ct IAC est-elle comprise entre 29,3
NON
Échec de l'analyse
ACTION :Répéter l'analyse.
OUI
Échec de l'analyse
ACTION : Répéter l'analyse.
NON
Vérifier le témoin positif.
La valeur de Ct PNE MycAssay est-elle comprise
OUI
Positif pour l'ADN de *Pneumocystis*
OUI
Vérifier l'échantillon de patient.
La valeur de Ct PNE est-elle < 39,0 ?
NON
Négatif pour l'ADN de *Pneumocystis*
OUI
Vérifier l'échantillon de patient.
La valeur de Ct IAC est-elle comprise entre 29,3 et
NON
Échec de l'IAC
ACTION : Répéter l'analyse de l'échantillon. En cas d'obtention du même résultat, suspicion de présence d'inhibiteur dans l'échantillon.

Échantillon	Ct PNE MycAssay	Ct IAC MycAssay	Interprétation	Action nécessaire
Témoin négatif	39,0 ou non détectée	Entre 29,3 et 33,3	Témoin négatif acceptable	Les résultats patient sont valides.
Témoin négatif	39,0 ou non détectée	< 29,3 ou > 33,3	Échec du témoin négatif	Répéter toute l'analyse.
Témoin négatif	< 39,0	Entre 29,3 et 33,3	Contamination	Répéter toute l'analyse.
Témoin positif	Entre 20,0 et 25,0	Sans objet	Témoin positif acceptable	Les résultats patient sont valides.
Témoin positif	< 20,0 ou > 25,0	Sans objet	Échec du témoin positif	Répéter toute l'analyse.
Patient	39,0 ou non détectée	Entre 29,3 et 33,3	Négatif pour *Pneumocystis*	Résultat à mentionner dans le rapport : Résultat 1
Patient	< 39,0	Sans objet	Positif pour *Pneumocystis*	Résultat à mentionner dans le rapport : Résultat 2
Patient	39,0 ou non détectée	< 29,3 ou > 33,3	Échec de l'IAC dans l'échantillon	Répéter l'analyse de l'échantillon. Résultat 3

*Pour en savoir plus sur les Résultats 1, 2 et 3, voir la section Rapport clinique.

4. Dépannage

4.1 Le témoin négatif a émis un signal positif dans la voie FAM :

- Une contamination s'est produite pendant la préparation. Aucun des résultats de l'analyse n'est fiable.

→ Répéter toute l'analyse en faisant preuve de précaution lors de l'ajout des matrices, en particulier du témoin positif (Tube 4) pour éviter toute contamination croisée.

→ Veiller à ce que le plan de travail et l'équipement soient bien décontaminés avant et après utilisation.

- Le témoin négatif a été mal positionné sur l'automate.

→ Veiller à correctement nommer toutes les réactions dans le logiciel et à bien orienter les barrettes de tubes sur l'automate.

- Des tubes ou plaques autres que ceux recommandés ont été utilisés.

→ Les seuils sont valables uniquement avec les barrettes de tubes et de bouchons de PCR recommandés (Agilent Technologies réf. 401428 et 401425).

4.2 La valeur Ct de l'IAC du témoin négatif ne se trouve pas dans la plage acceptable :

- La PCR a été inhibée.

→ Vérifier que le plan de travail et l'équipement soient complètement secs après nettoyage avec un agent de décontamination et avant préparation de la PCR.

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section « Conservation » du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- Le réactif du Tube 1 ou du Tube 2 n'a pas été ajouté au mélange réactionnel pour PCR ou deux fois trop de réactif du Tube 2 a été ajouté.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide d'un tube réactionnel est plus élevé ou plus bas que celui des autres tubes.

- Des tubes ou plaques autres que ceux recommandés ont été utilisés.

→ Les seuils sont valables uniquement avec les barrettes de tubes et de bouchons de PCR Agilent Technologies réf. 401428 et 401425.

4.3 Le témoin positif donne un résultat négatif ou en dehors de la plage acceptable :

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section « Conservation » du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- Une erreur s'est produite lors de la préparation et la matrice du témoin positif (Tube 4) a été placée dans le mauvais tube réactionnel.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide d'un tube réactionnel est plus élevé que celui d'un autre.

- Le réactif du Tube 1 ou du Tube 2 n'a pas été ajouté au mélange réactionnel.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide de ce tube réactionnel est plus bas que celui des autres tubes.

- Le témoin positif a été mal positionné sur l'automate.

→ Veiller à correctement nommer toutes les réactions dans le logiciel et à bien orienter les barrettes de tubes sur l'automate.

- Des tubes ou plaques autres que ceux recommandés ont été utilisés.

→ Les seuils sont valables uniquement avec les barrettes de tubes et de bouchons de PCR Agilent Technologies réf. 401428 et 401425.

4.4 Les échantillons de patient donnent le résultat « Échec de l'IAC » :

- Il est probable que les échantillons extraits contiennent des inhibiteurs de la PCR.

→ Il est recommandé d'extraire l'ADN à l'aide du kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra™.

4.5 Aucune voie ne donne de résultat pour aucun des échantillons ni des témoins :

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section « Conservation » du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- L'automate ne fonctionne pas de façon optimale.

→ Vérifier que l'entretien et l'étalonnage de l'automate de PCR en temps réel sont à jour, conformément aux instructions du guide d'installation et de maintenance.

- La configuration du logiciel a été faite avec un fichier de mode opératoire incorrect.

→ Se reporter à la Section 2 et sélectionner le fichier de mode opératoire correct sur le **CD-ROM de mode opératoire Myconostica**, tel qu'indiqué pour chaque version du logiciel. Seul le fichier compatible avec le logiciel peut être chargé. Répéter l'analyse avec le fichier de mode opératoire correct.

Pour toute question ou en cas de problème, contacter le Service d'assistance technique (productsupport@lab21.com).

Caractéristiques de performance et limites

Performances analytiques des automates de la série Mx3000

Le kit a initialement été validé à l'aide de l'automate Cepheid SmartCycler®. Certaines revendications de performances du test ont été validées à nouveau sur l'automate Mx3005P® à l'aide de barrettes de tubes de PCR de qualité optique munis de bouchons (Agilent Technologies réf. 401428 et 401425), comme indiqué ci-dessous.

Sensibilité analytique

À partir du mode opératoire décrit ci-dessus et d'une molécule d'ADN recombinant de *Pneumocystis* générée par Myconostica, le seuil de détection de *Pneumocystis* déterminé est < 50 copies. Cette valeur a été déterminée à l'aide d'un plasmide recombinant contenant la séquence cible. Dans la mesure où la séquence cible de *Pneumocystis* est une cible mitochondriale, il y a de nombreuses copies par cellule mais le nombre exact est inconnu.

Performances établies à l'aide de l'automate Cepheid SmartCycler®

Sélectivité analytique

La sélectivité analytique a été évaluée à l'aide d'ADN extrait de diverses espèces fongiques et non fongiques. Les espèces suivantes n'ont pas donné de résultat positif :
Alternaria alternata, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, Cladosporium spp., Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum. Les espèces bactériennes suivantes n'ont pas donné de résultat positif : *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius*.

L'ADN du génome humain ne donne pas de résultat positif avec ce test.

Substances interférentes (contre-indications)

Les composés suivants ont été analysés à des concentrations pertinentes du point de vue clinique et déterminés comme non inhibiteurs du test : acétylcystéine, amphotéricine, dipropionate de béclométasone, budésonide, colistiméthate sodique, propionate de fluticasone, fumarate de formotérol dihydraté, bromure d'ipratropium, lidocaïne, mannitol, sulfate de salbutamol, salmétérol, Septrin (triméthoprime sulfaméthoxazole), chlorure de sodium, cromoglicate de sodium, terbutaline, tobramycine.

Évaluation des performances

La valeur limite clinique de 39,0 a été déterminée après analyse d'un ensemble d'échantillons cliniques provenant de plusieurs populations de patients.

Des échantillons cliniques prélevés par LBA dans deux hôpitaux, dont l'ADN a été extrait avec le kit MycXtra® puis qui ont été congelés, ont servi à évaluer les performances du kit MycAssay™ Pneumocystis. Les résultats obtenus par PCR ont été comparés à ceux obtenus par immunofluorescence.

Comparaison entre la PCR et le diagnostic microscopique

	Microscopie positive	Microscopie négative		
PCR positive	45	8	0,85	VPP
PCR négative	2	33	0,94	VPN
	0,96	0,80		
	Sensibilité	Spécificité		

Tableau 1 : Spécificité et sensibilité du diagnostic par le kit MycAssay™ Pneumocystis comparées à celles de l'immunofluorescence.

Le Tableau 1 présente des données obtenues pour des patients infectés par le VIH, des patients non infectés par le VIH et des patients dont l'infection par le VIH est indéterminée. Chez les patients atteints de pneumonie à *Pneumocystis*, la quantité d'organismes détectables est très variable. Plus la valeur de Ct est faible, plus la probabilité de la maladie est élevée. Le nombre d'organismes détectables tend à être plus élevé chez les patients infectés par le VIH qui souffrent de pneumonie à *Pneumocystis* que chez les patients non infectés par le virus, bien que ces deux catégories présentent un chevauchement considérable. Ce chevauchement est visible sur le diagramme de dispersion de la Figure 3 ci-dessous. Pour des résultats complets, dans la mesure où le jeu de données du Tableau 1 inclut des patients dont l'infection par le VIH est indéterminée, le diagramme de dispersion de ce groupe est donné à la colonne 3 de la Figure 1 :

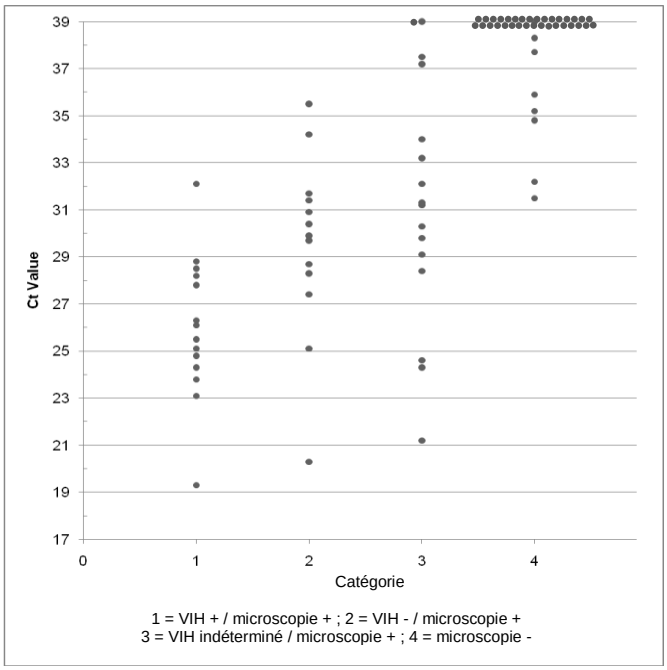


Figure 1 : Diagramme de dispersion des valeurs de Ct obtenues à partir d'ADN extrait d'échantillons respiratoires de patients. Quatre groupes sont décrits.

Rapport clinique

Le kit MycAssay™ Pneumocystis est destiné à servir d'aide au diagnostic de la pneumonie à Pneumocystis. Les résultats doivent être considérés dans le contexte de l'état clinique du patient et en association avec les résultats d'autres tests de diagnostic.

Il est recommandé d'employer la phraséologie suivante dans le rapport, en fonction de l'interprétation des résultats du test.

Résultat 1
« *Pneumocystis jirovecii* non détecté. »

Résultat 2
« *Pneumocystis jirovecii* détecté. Résultat positif. Indiquer la valeur de Ct. »

Résultat 3
« Échec du test, présence d'inhibiteurs ou d'une autre substance inconnue. »

Plus la valeur de Ct est faible, plus la probabilité de la maladie est élevée. Les valeurs de Ct proches de la valeur limite de 39,0 traduisent plutôt une colonisation qu'une infection. Toutefois, certains malades peuvent présenter un taux de *P. jirovecii* très faible en raison de la mauvaise qualité de l'échantillon ou du traitement préalable ou en raison de la nature de la charge fongique chez ces patients.

Limites du mode opératoire

- La principale limite de ce mode opératoire est liée à la qualité de l'échantillon primaire.
  - Si l'échantillon est très petit ou n'a pas été prélevé dans la zone affectée du poumon, le test peut se révéler moins sensible et donner un résultat faussement négatif.

- Il convient de centrifuger les échantillons de LBA avant extraction de l'ADN du culot.
- Les données ont également montré qu'une diminution, lors de l'étape de centrifugation, du volume de surnageant utilisé pour l'extraction réduit la proportion d'inhibiteurs pénétrant dans le système.

- L'évaluation clinique des performances n'a pas été confirmée sur l'automate MX3005P®.

- Bien que le procédé d'extraction d'ADN fongique MycXtra™ soit conçu pour éliminer les inhibiteurs de la PCR, tous les médicaments et toutes les populations de patients n'ont pas été évalués.

- Ce mode opératoire n'a pas été évalué de manière approfondie sur les expectorations et n'a pas non plus été évalué sur les échantillons provoqués dans le sérum physiologique ni sur des échantillons prélevés sur des enfants.

- Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus en cas de contamination externe de l'échantillon initial ou du test, par exemple par de l'air contenant *P. jirovecii*, par une mauvaise technique de manipulation du témoin positif ou par contamination externe (en particulier de la pipette) par l'ADN de *P. jirovecii*.

- Dans la mesure où un résultat vraiment positif peut être obtenu avec des échantillons de patients colonisés temporairement ou en permanence par *P. jirovecii*, le résultat du test doit être interprété cliniquement.

LICENCE

TopTaq™ Hot Start est fourni par QIAGEN. QIAGEN® est une marque déposée de Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne.

SmartCycler® est une marque déposée de Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, Californie, 94089, États-Unis.

Ce produit est vendu sous licence par le Public Health Research Institute (PHRI), Newark, New Jersey, États-Unis et il est sous protection de la propriété intellectuelle du PHRI. Son utilisation se limite au diagnostic humain *in vitro*.

Mx3000P® et Mx3005P® sont des marques déposées de Stratagene. MxPro™ est une marque de commerce de Stratagene.

IVD

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882 Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE